



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 100 55 789 A 1

21 Aktenzeichen: 100 55 789.9
22 Anmeldetag: 10. 11. 2000
43 Offenlegungstag: 6. 6. 2002

51 Int. Cl. 7:
C 07 K 14/245
C 07 H 21/04
A 61 K 38/16
A 61 K 39/395
A 01 N 63/00
A 61 K 39/108
A 61 P 31/04

Serial No. 10/579,248
Group No. 1752
Confirmation No.7812

DE 100 55 789 A 1

71 Anmelder:
Pharma-Zentrale GmbH, 58313 Herdecke, DE
74 Vertreter:
Harmsen & Utescher, Rechtsanwälte,
Patentanwälte, 20457 Hamburg

72 Erfinder:
Hacker, Jörg, Prof. Dr., 97218 Gerbrunn, DE;
Blum-Oehler, Gabriele, Dr., 97072 Würzburg, DE;
Jung, Günther, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE;
Hantke, Klaus, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE; Patzer,
Silke, Dr., 71134 Aidlingen, DE; Moreno, Felipe,
Prof. Dr., Madrid, ES; Baquero, Fernando, Prof. Dr.,
28028 Madrid, ES; Baquero, Rosario, Madrid, ES;
Bravo, Daniel, Cerceda, ES; Sonenborn, Ulrich, Dr.,
44799 Bochum, DE; Schulze, Jürgen, Dr., 14558
Bergholz-Rehbrücke, DE; Proppert, Hans, 58095
Hagen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 DNA-Sequenz und Microcin aus Escherichia coli Stamm DSM 6601

57 Die Erfindung betrifft eine DNA-Sequenz mit der in Ab-
bildung dargestellten Nucleotidfolge und das dadurch co-
dierte Peptid, Derivate des Peptids sowie die Verwendung
der DNA-Sequenz, des Peptids sowie der Peptidderivate.

... 1 ...
... 2 ...
... 3 ...
... 4 ...
... 5 ...
... 6 ...
... 7 ...
... 8 ...
... 9 ...
... 10 ...
... 11 ...
... 12 ...
... 13 ...
... 14 ...
... 15 ...
... 16 ...
... 17 ...
... 18 ...
... 19 ...
... 20 ...
... 21 ...
... 22 ...
... 23 ...
... 24 ...
... 25 ...
... 26 ...
... 27 ...
... 28 ...
... 29 ...
... 30 ...
... 31 ...
... 32 ...
... 33 ...
... 34 ...
... 35 ...
... 36 ...
... 37 ...
... 38 ...
... 39 ...
... 40 ...
... 41 ...
... 42 ...
... 43 ...
... 44 ...
... 45 ...
... 46 ...
... 47 ...
... 48 ...
... 49 ...
... 50 ...
... 51 ...
... 52 ...
... 53 ...
... 54 ...
... 55 ...
... 56 ...
... 57 ...
... 58 ...
... 59 ...
... 60 ...
... 61 ...
... 62 ...
... 63 ...
... 64 ...
... 65 ...
... 66 ...
... 67 ...
... 68 ...
... 69 ...
... 70 ...
... 71 ...
... 72 ...
... 73 ...
... 74 ...
... 75 ...
... 76 ...
... 77 ...
... 78 ...
... 79 ...
... 80 ...
... 81 ...
... 82 ...
... 83 ...
... 84 ...
... 85 ...
... 86 ...
... 87 ...
... 88 ...
... 89 ...
... 90 ...
... 91 ...
... 92 ...
... 93 ...
... 94 ...
... 95 ...
... 96 ...
... 97 ...
... 98 ...
... 99 ...
... 100 ...
... 101 ...
... 102 ...
... 103 ...
... 104 ...
... 105 ...
... 106 ...
... 107 ...
... 108 ...
... 109 ...
... 110 ...
... 111 ...
... 112 ...
... 113 ...
... 114 ...
... 115 ...
... 116 ...
... 117 ...
... 118 ...
... 119 ...
... 120 ...
... 121 ...
... 122 ...
... 123 ...
... 124 ...
... 125 ...
... 126 ...
... 127 ...
... 128 ...
... 129 ...
... 130 ...
... 131 ...
... 132 ...
... 133 ...
... 134 ...
... 135 ...
... 136 ...
... 137 ...
... 138 ...
... 139 ...
... 140 ...
... 141 ...
... 142 ...
... 143 ...
... 144 ...
... 145 ...
... 146 ...
... 147 ...
... 148 ...
... 149 ...
... 150 ...
... 151 ...
... 152 ...
... 153 ...
... 154 ...
... 155 ...
... 156 ...
... 157 ...
... 158 ...
... 159 ...
... 160 ...
... 161 ...
... 162 ...
... 163 ...
... 164 ...
... 165 ...
... 166 ...
... 167 ...
... 168 ...
... 169 ...
... 170 ...
... 171 ...
... 172 ...
... 173 ...
... 174 ...
... 175 ...
... 176 ...
... 177 ...
... 178 ...
... 179 ...
... 180 ...
... 181 ...
... 182 ...
... 183 ...
... 184 ...
... 185 ...
... 186 ...
... 187 ...
... 188 ...
... 189 ...
... 190 ...
... 191 ...
... 192 ...
... 193 ...
... 194 ...
... 195 ...
... 196 ...
... 197 ...
... 198 ...
... 199 ...
... 200 ...
... 201 ...
... 202 ...
... 203 ...
... 204 ...
... 205 ...
... 206 ...
... 207 ...
... 208 ...
... 209 ...
... 210 ...
... 211 ...
... 212 ...
... 213 ...
... 214 ...
... 215 ...
... 216 ...
... 217 ...
... 218 ...
... 219 ...
... 220 ...
... 221 ...
... 222 ...
... 223 ...
... 224 ...
... 225 ...
... 226 ...
... 227 ...
... 228 ...
... 229 ...
... 230 ...
... 231 ...
... 232 ...
... 233 ...
... 234 ...
... 235 ...
... 236 ...
... 237 ...
... 238 ...
... 239 ...
... 240 ...
... 241 ...
... 242 ...
... 243 ...
... 244 ...
... 245 ...
... 246 ...
... 247 ...
... 248 ...
... 249 ...
... 250 ...
... 251 ...
... 252 ...
... 253 ...
... 254 ...
... 255 ...
... 256 ...
... 257 ...
... 258 ...
... 259 ...
... 260 ...
... 261 ...
... 262 ...
... 263 ...
... 264 ...
... 265 ...
... 266 ...
... 267 ...
... 268 ...
... 269 ...
... 270 ...
... 271 ...
... 272 ...
... 273 ...
... 274 ...
... 275 ...
... 276 ...
... 277 ...
... 278 ...
... 279 ...
... 280 ...
... 281 ...
... 282 ...
... 283 ...
... 284 ...
... 285 ...
... 286 ...
... 287 ...
... 288 ...
... 289 ...
... 290 ...
... 291 ...
... 292 ...
... 293 ...
... 294 ...
... 295 ...
... 296 ...
... 297 ...
... 298 ...
... 299 ...
... 300 ...
... 301 ...
... 302 ...
... 303 ...
... 304 ...
... 305 ...
... 306 ...
... 307 ...
... 308 ...
... 309 ...
... 310 ...
... 311 ...
... 312 ...
... 313 ...
... 314 ...
... 315 ...
... 316 ...
... 317 ...
... 318 ...
... 319 ...
... 320 ...
... 321 ...
... 322 ...
... 323 ...
... 324 ...
... 325 ...
... 326 ...
... 327 ...
... 328 ...
... 329 ...
... 330 ...
... 331 ...
... 332 ...
... 333 ...
... 334 ...
... 335 ...
... 336 ...
... 337 ...
... 338 ...
... 339 ...
... 340 ...
... 341 ...
... 342 ...
... 343 ...
... 344 ...
... 345 ...
... 346 ...
... 347 ...
... 348 ...
... 349 ...
... 350 ...
... 351 ...
... 352 ...
... 353 ...
... 354 ...
... 355 ...
... 356 ...
... 357 ...
... 358 ...
... 359 ...
... 360 ...
... 361 ...
... 362 ...
... 363 ...
... 364 ...
... 365 ...
... 366 ...
... 367 ...
... 368 ...
... 369 ...
... 370 ...
... 371 ...
... 372 ...
... 373 ...
... 374 ...
... 375 ...
... 376 ...
... 377 ...
... 378 ...
... 379 ...
... 380 ...
... 381 ...
... 382 ...
... 383 ...
... 384 ...
... 385 ...
... 386 ...
... 387 ...
... 388 ...
... 389 ...
... 390 ...
... 391 ...
... 392 ...
... 393 ...
... 394 ...
... 395 ...
... 396 ...
... 397 ...
... 398 ...
... 399 ...
... 400 ...
... 401 ...
... 402 ...
... 403 ...
... 404 ...
... 405 ...
... 406 ...
... 407 ...
... 408 ...
... 409 ...
... 410 ...
... 411 ...
... 412 ...
... 413 ...
... 414 ...
... 415 ...
... 416 ...
... 417 ...
... 418 ...
... 419 ...
... 420 ...
... 421 ...
... 422 ...
... 423 ...
... 424 ...
... 425 ...
... 426 ...
... 427 ...
... 428 ...
... 429 ...
... 430 ...
... 431 ...
... 432 ...
... 433 ...
... 434 ...
... 435 ...
... 436 ...
... 437 ...
... 438 ...
... 439 ...
... 440 ...
... 441 ...
... 442 ...
... 443 ...
... 444 ...
... 445 ...
... 446 ...
... 447 ...
... 448 ...
... 449 ...
... 450 ...
... 451 ...
... 452 ...
... 453 ...
... 454 ...
... 455 ...
... 456 ...
... 457 ...
... 458 ...
... 459 ...
... 460 ...
... 461 ...
... 462 ...
... 463 ...
... 464 ...
... 465 ...
... 466 ...
... 467 ...
... 468 ...
... 469 ...
... 470 ...
... 471 ...
... 472 ...
... 473 ...
... 474 ...
... 475 ...
... 476 ...
... 477 ...
... 478 ...
... 479 ...
... 480 ...
... 481 ...
... 482 ...
... 483 ...
... 484 ...
... 485 ...
... 486 ...
... 487 ...
... 488 ...
... 489 ...
... 490 ...
... 491 ...
... 492 ...
... 493 ...
... 494 ...
... 495 ...
... 496 ...
... 497 ...
... 498 ...
... 499 ...
... 500 ...
... 501 ...
... 502 ...
... 503 ...
... 504 ...
... 505 ...
... 506 ...
... 507 ...
... 508 ...
... 509 ...
... 510 ...
... 511 ...
... 512 ...
... 513 ...
... 514 ...
... 515 ...
... 516 ...
... 517 ...
... 518 ...
... 519 ...
... 520 ...
... 521 ...
... 522 ...
... 523 ...
... 524 ...
... 525 ...
... 526 ...
... 527 ...
... 528 ...
... 529 ...
... 530 ...
... 531 ...
... 532 ...
... 533 ...
... 534 ...
... 535 ...
... 536 ...
... 537 ...
... 538 ...
... 539 ...
... 540 ...
... 541 ...
... 542 ...
... 543 ...
... 544 ...
... 545 ...
... 546 ...
... 547 ...
... 548 ...
... 549 ...
... 550 ...
... 551 ...
... 552 ...
... 553 ...
... 554 ...
... 555 ...
... 556 ...
... 557 ...
... 558 ...
... 559 ...
... 560 ...
... 561 ...
... 562 ...
... 563 ...
... 564 ...
... 565 ...
... 566 ...
... 567 ...
... 568 ...
... 569 ...
... 570 ...
... 571 ...
... 572 ...
... 573 ...
... 574 ...
... 575 ...
... 576 ...
... 577 ...
... 578 ...
... 579 ...
... 580 ...
... 581 ...
... 582 ...
... 583 ...
... 584 ...
... 585 ...
... 586 ...
... 587 ...
... 588 ...
... 589 ...
... 590 ...
... 591 ...
... 592 ...
... 593 ...
... 594 ...
... 595 ...
... 596 ...
... 597 ...
... 598 ...
... 599 ...
... 600 ...
... 601 ...
... 602 ...
... 603 ...
... 604 ...
... 605 ...
... 606 ...
... 607 ...
... 608 ...
... 609 ...
... 610 ...
... 611 ...
... 612 ...
... 613 ...
... 614 ...
... 615 ...
... 616 ...
... 617 ...
... 618 ...
... 619 ...
... 620 ...
... 621 ...
... 622 ...
... 623 ...
... 624 ...
... 625 ...
... 626 ...
... 627 ...
... 628 ...
... 629 ...
... 630 ...
... 631 ...
... 632 ...
... 633 ...
... 634 ...
... 635 ...
... 636 ...
... 637 ...
... 638 ...
... 639 ...
... 640 ...
... 641 ...
... 642 ...
... 643 ...
... 644 ...
... 645 ...
... 646 ...
... 647 ...
... 648 ...
... 649 ...
... 650 ...
... 651 ...
... 652 ...
... 653 ...
... 654 ...
... 655 ...
... 656 ...
... 657 ...
... 658 ...
... 659 ...
... 660 ...
... 661 ...
... 662 ...
... 663 ...
... 664 ...
... 665 ...
... 666 ...
... 667 ...
... 668 ...
... 669 ...
... 670 ...
... 671 ...
... 672 ...
... 673 ...
... 674 ...
... 675 ...
... 676 ...
... 677 ...
... 678 ...
... 679 ...
... 680 ...
... 681 ...
... 682 ...
... 683 ...
... 684 ...
... 685 ...
... 686 ...
... 687 ...
... 688 ...
... 689 ...
... 690 ...
... 691 ...
... 692 ...
... 693 ...
... 694 ...
... 695 ...
... 696 ...
... 697 ...
... 698 ...
... 699 ...
... 700 ...
... 701 ...
... 702 ...
... 703 ...
... 704 ...
... 705 ...
... 706 ...
... 707 ...
... 708 ...
... 709 ...
... 710 ...
... 711 ...
... 712 ...
... 713 ...
... 714 ...
... 715 ...
... 716 ...
... 717 ...
... 718 ...
... 719 ...
... 720 ...
... 721 ...
... 722 ...
... 723 ...
... 724 ...
... 725 ...
... 726 ...
... 727 ...
... 728 ...
... 729 ...
... 730 ...
... 731 ...
... 732 ...
... 733 ...
... 734 ...
... 735 ...
... 736 ...
... 737 ...
... 738 ...
... 739 ...
... 740 ...
... 741 ...
... 742 ...
... 743 ...
... 744 ...
... 745 ...
... 746 ...
... 747 ...
... 748 ...
... 749 ...
... 750 ...
... 751 ...
... 752 ...
... 753 ...
... 754 ...
... 755 ...
... 756 ...
... 757 ...
... 758 ...
... 759 ...
... 760 ...
... 761 ...
... 762 ...
... 763 ...
... 764 ...
... 765 ...
... 766 ...
... 767 ...
... 768 ...
... 769 ...
... 770 ...
... 771 ...
... 772 ...
... 773 ...
... 774 ...
... 775 ...
... 776 ...
... 777 ...
... 778 ...
... 779 ...
... 780 ...
... 781 ...
... 782 ...
... 783 ...
... 784 ...
... 785 ...
... 786 ...
... 787 ...
... 788 ...
... 789 ...
... 790 ...
... 791 ...
... 792 ...
... 793 ...
... 794 ...
... 795 ...
... 796 ...
... 797 ...
... 798 ...
... 799 ...
... 800 ...
... 801 ...
... 802 ...
... 803 ...
... 804 ...
... 805 ...
... 806 ...
... 807 ...
... 808 ...
... 809 ...
... 810 ...
... 811 ...
... 812 ...
... 813 ...
... 814 ...
... 815 ...
... 816 ...
... 817 ...
... 818 ...
... 819 ...
... 820 ...
... 821 ...
... 822 ...
... 823 ...
... 824 ...
... 825 ...
... 826 ...
... 827 ...
... 828 ...
... 829 ...
... 830 ...
... 831 ...
... 832 ...
... 833 ...
... 834 ...
... 835 ...
... 836 ...
... 837 ...
... 838 ...
... 839 ...
... 840 ...
... 841 ...
... 842 ...
... 843 ...
... 844 ...
... 845 ...
... 846 ...
... 847 ...
... 848 ...
... 849 ...
... 850 ...
... 851 ...
... 852 ...
... 853 ...
... 854 ...
... 855 ...
... 856 ...
... 857 ...
... 858 ...
... 859 ...
... 860 ...
... 861 ...
... 862 ...
... 863 ...
... 864 ...
... 865 ...
... 866 ...
... 867 ...
... 868 ...
... 869 ...
... 870 ...
... 871 ...
... 872 ...
... 873 ...
... 874 ...
... 875 ...
... 876 ...
... 877 ...
... 878 ...
... 879 ...
... 880 ...
... 881 ...
... 882 ...
... 883 ...
... 884 ...
... 885 ...
... 886 ...
... 887 ...
... 888 ...
... 889 ...
... 890 ...
... 891 ...
... 892 ...
... 893 ...
... 894 ...
... 895 ...
... 896 ...
... 897 ...
... 898 ...
... 899 ...
... 900 ...
... 901 ...
... 902 ...
... 903 ...
... 904 ...
... 905 ...
... 906 ...
... 907 ...
... 908 ...
... 909 ...
... 910 ...
... 911 ...
... 912 ...
... 913 ...
... 914 ...
... 915 ...
... 916 ...
... 917 ...
... 918 ...
... 919 ...
... 920 ...
... 921 ...
... 922 ...
... 923 ...
... 924 ...
... 925 ...
... 926 ...
... 927 ...
... 928 ...
... 929 ...
... 930 ...
... 931 ...
... 932 ...
... 933 ...
... 934 ...
... 935 ...
... 936 ...
... 937 ...
... 938 ...
... 939 ...
... 940 ...
... 941 ...
... 942 ...
... 943 ...
... 944 ...
... 945 ...
... 946 ...
... 947 ...
... 948 ...
... 949 ...
... 950 ...
... 951 ...
... 952 ...
... 953 ...
... 954 ...
... 955 ...
... 956 ...
... 957 ...
... 958 ...
... 959 ...
... 960 ...
... 961 ...
... 962 ...
... 963 ...
... 964 ...
... 965 ...
... 966 ...
... 967 ...
... 968 ...
... 969 ...
... 970 ...
... 971 ...
... 972 ...
... 973 ...
... 974 ...
... 975 ...
... 976 ...
... 977 ...
... 978 ...
... 979 ...
... 980 ...
... 981 ...
... 982 ...
... 983 ...
... 984 ...
... 985 ...
... 986 ...
... 987 ...
... 988 ...
... 989 ...
... 990 ...
... 991 ...
... 992 ...
... 993 ...
... 994 ...
... 995 ...
... 996 ...
... 997 ...
... 998 ...
... 999 ...
... 1000 ...

DE 100 55 789 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft eine DNA-Sequenz und ein neues hierdurch codiertes Microcin aus *Escherichia coli* Stamm DSM 6601.

[0002] *Escherichia coli* ist ein gramnegatives Bakterium, das in der menschlichen und tierischen Darmflora, aber auch extraintestinal vorkommt. *E. coli* tritt in zahlreichen Varianten auf, die sich hinsichtlich der Kapsel-, Oberflächen- und Flagellenantigene unterscheiden und in zahlreiche serologische Typen unterteilt werden können. Die Einordnung nach den Serotypen läßt allerdings keine Aussage über die unterschiedliche Virulenz der Keime zu. Vertreter ein- und desselben Serotyps können sowohl im menschlichen als auch im tierischen Körper ein unterschiedliches Pathogenitätspotential besitzen, das im Extremfall von avirulent bis hochgradig pathogen reichen kann. Der *E. coli* Stamm DSM 6601 gehört zu der Serogruppe O6:K5 und wird als nicht human und nicht tierpathogen bewertet.

[0003] Als Bakteriocine bezeichnet man spezifische Proteine, die von bestimmten Bakterien produziert werden und mit abtötender Wirkung gegen andere Stämme derselben oder einer nahe verwandten Bakterienart gerichtet sind. Es sind bereits über zwanzig Colicine aus *E. coli* bekannt, die jeweils hohe antibakterielle Spezifität aufweisen. Zu den Bakteriocinen zählen auch die sogenannten Microcine, die u. a. auch von bestimmten *E. coli*-Stämmen produziert werden. Bakteriocine werden, abgesehen von ihrer antibiotischen Wirkung, für die Taxonomie von Bakterienstämmen eingesetzt.

[0004] Es war bekannt, daß *E. coli* Stamm DSM 6601 antibiotische Aktivität aufweist, die dem Vorhandensein eines Microcins zugeschrieben wurde, das im folgenden als Microcin M (McmC) bezeichnet wird. Versuche, das Peptid durch Anreicherung aus Flüssigkulturen oder durch Extraktion von Kulturen auf Agarplatten oder aus dem Agar anzureichern, brachten keine verwertbaren Ergebnisse. Es wurde daher versucht, das Microcin mit Hilfe genetischer Methoden zu identifizieren. Mit dem oben genannten Stamm von *E. coli* wurde eine Mu-Mutagenese durchgeführt. Der Phage Mu kann sich nach Infektion einer Bakterienzelle wie ein Transposon verhalten und an einem beliebigen Ort in der DNA integrieren und dadurch eine Mutation hervorrufen. Im vorliegenden Fall wurde der Phage Mud 1 nach der Vorschrift von Casadaban (Casadaban und Cohen, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4530-4533) verwendet. Durch die Mutagenese wurde eine Mutante isoliert, die kein Microcin mehr produzierte. Aus der chromosomalen DNA dieser Mutante wurde das für die Microcinsynthese kodierende DNA-Fragment isoliert und nach Insertion in den Vektor pUC18 und PCR-Amplifikation kloniert und sequenziert.

[0005] Überraschenderweise wurde anhand der Sequenzanalyse festgestellt, daß die mcm-Region aus *E. coli* DSM 6601 einen dem Colicin V ähnlichen Hemmstoff kodiert, der im folgenden Microcin M (McmC) genannt wird. Die Abb. 1 zeigt die entsprechende Sequenz der mcm-Region.

[0006] Die Abb. 1a zeigt in der Übersicht die in diesem Bereich aufgrund der DNA-Sequenz vorhergesagten Gene. Die Genprodukte McmA und McmB zeigen hohe Sequenzähnlichkeit zu den Exportproteinen für Colicin und Microcin 24. Es folgt das Gen mcmI, dessen Produkt nur geringe Ähnlichkeit zu den Immunitätsproteinen der beiden obigen Microcine zeigt. Direkt im Anschluß wird das Microcin M (McmC) kodiert. Das darauf folgende Gen mcmP wird in entgegengesetzter Richtung abgelesen und wirkt aufgrund seiner Homologien zum *cypA*-Gen (Colicin V Produktion) bei der Expression von McmC mit. Stromauf vom mcmA-Gen liegt das Gen mcmD, dessen Produkt Ähnlichkeit mit den fettsäureübertragenden Proteinen (Transacylasen) aufweist, die auch in die posttranslationale Modifikation der *E. coli*-Hämolyse involviert sind.

[0007] Zur Erläuterung wird darauf hingewiesen, daß das Protein CvaB zur Familie der MDR-Proteine (Multi-Drug-Resistance) gehört, die ATP-abhängig den Export oder Import von kleinen Substanzen, aber auch den Export von Proteinen katalysieren. Es handelt sich um Proteine mit 6 oder 8 hydrophoben Helices in der Membran und einer Domäne mit einer ATP-spaltenden Aktivität, womit der Transportvorgang energetisiert wird. Die ATP-spaltende Aktivität kann auch als separates Protein vorliegen. CvaB und zehn weitere verwandte Proteine besitzen im Gegensatz zu anderen MDR-Proteinen eine N-terminale Domäne mit Cysteinproteinase-Aktivität im Cytoplasma. Diese Proteinase spaltet beim Export eine kleine Leaderpeptidsequenz vom N-terminalen Ende des Colicins V ab und zwar nach der Gly-Gly Erkennungssequenz (siehe Pfeil bei dem Homologieversuch in Abb. 1a). Eine solche Gly-Gly Sequenz findet sich auch in der abgeleiteten Sequenz für das unreife McmC, einem Peptid aus 92 Aminosäuren. Für das reife McmG-Peptid ist somit eine Kettenlänge von 77 Aminosäuren vorgegeben.

[0008] Das Protein CvaA wird über eine alpha-Helix in der Cytoplasmamembran verankert und dient als Verbindungsprotein (Connector) zur äußeren Membran. In der äußeren Membran bindet CvaA an das TolC Protein. Soweit bekannt, bilden die Proteine CvaB, CvaA und TolG einen Proteinkomplex, der den Export von Colicin V über die Cytoplasmamembran und die äußere Membran in einem Schritt katalysiert. Sehr ähnliche Exportapparate hat man z. B. für das *E. coli*-Hämolyse oder für Proteinase aus *Erwinia*-Arten gefunden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu CvaA und CvaB dürften das McmA und McmB dieselben Funktionen beim Export und bei der Reifung von McmC erfüllen.

[0009] In den nachfolgenden Tabellen ist die prozentuale Identität der Microcine, der Exportproteine und der Immunitätsproteine sowie die prozentuale Identität im Vergleich zu anderen verwandten Proteinen zusammengestellt:

Tabelle 1a

Identität der Microcine im Einzelvergleich in Prozent

	CoIV	McmC	Mic24	MicE492
CoIV	100	35	19	15
McmC		100	10	28
Mic24			100	45
MicE492				100

Tabelle 1b

Identität der dem CvaA ähnlichen Exportproteine im Einzelvergleich in Prozent

	CvaA	McmA	MtfA
CvaA	100	97	71
McmA		100	71
MtfA			100

Tabelle 1c

Identität der dem CvaB verwandten Exportproteine in Prozent

	CvaB	McmB	MtfB
CvaB	100	89	73
McmB		100	75
MtfB			100

Tabelle 1d

Prozentuale Identität im Vergleich zu anderen McmD verwandten Proteinen. Abkürzungen: HlyCneim ein HlyC ähnliches Protein aus *Neisseria meningitidis*; HlyCec HlyC Protein aus *Escherichia coli*

	McmD	HlyCneim	HlyCec
McmD	100	25	12
HlyCneim		100	11
HlyCec			100

Tabelle 1e

Prozentuale Identität der Immunitätsproteine im Einzelvergleich. Abkürzungen: CvaI – Immunitätsprotein von ColV, McmI – Immunitätsprotein von Microcin McmC, MtfI – Immunitätsprotein von Microcin M24

	CvaI	McmI	MtfI
CvaI	100	23	14
McmI		100	22
MtfI			100

[0010] Aufgrund der DNA-Analyse ergibt sich für die neue Substanz ein Peptid mit 77 Aminosäuren, das aufgrund seiner Größe den Microcinen zugerechnet wird. Dieses reife Microcin (McmC) zeigt aber nur geringe Sequenzhomologie zu bekannten Polypeptiden wie z. B. Colicin V.

[0011] Zur Synthese und zur näheren Untersuchung des Peptids wurden überlappende Oligopeptide mit jeweils fünfzehn Aminosäuren synthetisiert, also 1 bis 15, 5 bis 20, 10 bis 25 usw., und zwar durch Oligopeptidsynthese unter Anwendung der Fmoc-Strategie auf einem Polystyrol-1% Divinylbenzolharz mit 2-Chlortriphenylmethylchlorid als Linker.

[0012] Die Gesamtsynthese des Microcin-Peptids kann in an sich bekannter Weise durch Segmentkondensation auf dem Harz unter Verwendung von drei bis vier Peptid-Segmenten und Einsatz des ABI-Peptidsynthesizers erfolgen, wobei vorzugsweise so vorgegangen wird, daß mit dem an das Harz gebundenen Segment I., bestehend aus den Aminosäuren 77 bis 54, die gereinigten Segmente II. (Aminosäuren 53 bis 24) und III. (Aminosäuren 23 bis 1) gekoppelt werden.

[0013] Die Herstellung von Lipopeptidmischungen zur Gewinnung von Antisera erfolgt in an sich bekannter Weise, wobei Pam₃Cys-Lys-Ser-Peptide zur Immunisierung verwendet werden können.

[0014] Zur Beschichtung von Streptavidinplatten für ELISA-Teste werden in an sich bekannter Weise Biotinyl-Aca-Aca-Peptide verwendet, wobei diese Beschichtungen sowohl mit den entsprechenden Einzelpeptiden als auch mit einer Mischung von Peptiden durchgeführt werden können.

[0015] Im folgenden wird die Erfindung anhand der Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Identifizierung und Sequenzanalyse der mcm-Region aus E. coli DSM 6601

[0016] Nach dem Verfahren von Casadaban et al. wurde eine Mutante, die kein Microcin mehr produzierte, im Platten-test mit dem Indikatorstamm H1941 identifiziert. Chromosomale DNA dieser Mutante wurde isoliert und mit dem Restriktionsenzym HincII verdaut, danach mit dem mittels SmaI geschnittenen Vektor pUC18 ligiert und mit den Primern MuD1 (spezifisch für ein Mu-DNA-Ende) und UNI (spezifisch für den ligierten pUC18 Vektor) in einer PCR amplifiziert. Das DNA-Fragment wurde nach bekannten Verfahren (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis; Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989) kloniert und sequenziert. Es stellte sich heraus, daß dieses DNA-Fragment hohe Sequenzähnlichkeit zu dem Colicin-V-Exportprotein B aufwies. Klonierung und Sequenzanalyse des gesamten Bereiches zeigten, daß diese Region einen dem Colicin V ähnlichen Hemmstoff kodiert.

Beispiel 2

Synthese des Microcins

[0017] Die Aminosäuresequenz des Microcin McmC läßt sich aus der DNA der Region, die dieses Peptid kodiert, ableiten und ergibt sich aus der beigefügten Abb. 3.

[0018] Zur Synthese des Peptids werden in an sich bekannter Weise (G. Jung, Ed.; Combinatorial Peptide and Non-Peptide Libraries, Wiley VCH, Weinheim, 1996) Oligopeptide mit fünfzehn Aminosäuren synthetisiert, die überlappend die Aminosäuren 1 bis 15, 5 bis 20, 10 bis 25, 15 bis 30 usw. aufweisen. Die Synthese erfolgt unter Verwendung von Fmoc-Schutzgruppen auf einem Polystyrol-1%-Divinylbenzolharz nach dem Merryfield-Verfahren mit 2-Chlortriphenylmethylchlorid als Linker.

[0019] Nach hinreichend langer Synthesedauer werden in den jeweiligen Ansätzen die Peptide vom Harz gelöst und unter Verwendung von HPLC und ES-MS-Spektroskopie untersucht. Die Sekundärstruktur kann zum Teil durch Untersuchung des Circular dichroismus festgestellt werden.

[0020] Die Gesamtsynthese des Peptids aus siebenundsiebzig Aminosäuren erfolgt unter Verwendung eines ABI-Peptidsynthesizers unter Kondensation von Peptidsegmenten auf dem Harz, wobei vorzugsweise mit dem harzgebundenen Peptidsegment I. (Aminosäuren 77 bis 54) angefangen wird und dann die gereinigten Segmente II. (Aminosäuren 53 bis 24) und III. (Aminosäuren 23 bis 1) gekoppelt werden.

[0021] Die freien Peptide können über HPLC gereinigt werden, wobei die Reinheit für die Derivatisierung etwa 90% betragen sollte.

[0022] Für die Derivatisierung zur Herstellung von Lipopeptiden wird nach publizierten Verfahren vorgegangen (K.-H. Wiesmüller, G. Jung, G. Hess; Vaccine 7: 29–33, 1989; G. Jung, K.-H. Wiesmüller, G. Becker, H.-J. Bühring, WG Bessler; Angewandte Chemie [Internat. Ed.] 24: 872–873, 1985). Die Herstellung von für ELISA-Teste geeigneten biotinilierten Peptiden erfolgt ebenfalls nach bereits publizierten Verfahren (G. Jung, Ed.; Combinatorial Peptide and Non-Peptide Libraries, Wiley VCH, Weinheim, 1996).

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Pharma-Zentrale GmbH

<120> DNA-Sequenz und Microcin aus Escherichia coli Stamm DSM
6601

<130> PT66/000

<140> DE 10055789.9

<141> 2000-11-10

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5381

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

```

ataagggaag tagtaatcat gtcttatata agggaaacca tcagaggaaa agatgaatgg 60
actgtttatg aacagatcgg ttttgcggtc agttgtatgc tctacaatcg taattacagt 120
ctgtatccgg tgtaaacat tcaatactgg actgaatatg cgatacagca taatcagatt 180
aaattcctgt ttgattcacg aggttttcca ctggcggtata ttacctgggc atatcttgag 240
gctgatacag aagcacgcct gctcagggat ccagaattca gggtgcatcc gtctgaatgg 300
aatgaagatg gaaggatctg gattctggat ttctgttgta aaccaggcct tggtcgaaaa 360
gttattgact atctcataca gcttcagcca tggggagaag gagaagtacg atgggtaagc 420
aggcgaaaga aaattgtgac atacatccct gagcggtgc ataaaacgta gtacctctga 480
agatacagag ataattgtaa attacgggtt aaatgcacg ctgatactat ttgacagga 540
ctctgtattt tctggctttg attatagcat ttcggttaac cagtgaaggt attacaggaa 600
aagtgtgagt aagaggagct attttgtttc gtcaggatgc tttagaaaac agaaaaatga 660
agtggcaggg acgggcaata ttacttcccg gaataccact atgggtaatc atgctgggaa 720
gcatagtgtt tattacggca tttctgatgt tcattattgt tggtagctat agccgccgtg 780
ttaatgtcag tggtagagtc acaacctggc caagagctgt caatatatat tcagggtgtac 840
agggatttgt tgtcaggcag tttgttcagt aaggacagtt gataaaaaaa ggggatcctg 900
tttatctgat tgacatcagt aaaagtacac gtagtggtat tgtcactgat aatcatcgtc 960
gggatataga aaaccagctg gttcgtgtgg acaagattat ttcccgctct gaagaaagta 1020
aaaaaataac gctggatacc ctggaaaaac aacgcctgca atacacagat gcgttttcgtc 1080
gctcatcaga tattatacag cgtgcagagg aagggataaa aataatgaaa aacaacatgg 1140
agaattacag aaactatcag acaaaagggc tgattaataa agatcagtta actaaccagg 1200
tggcattata ttatcagcaa caaaacaatc ttcttagcct gagcggacag aacgaacaga 1260
atgcctgca gataaccact ctggagagtc agattcagac tcaggcagca gattttgata 1320
accgtatcta ccagatggaa ctgcaacggt acgagttaca gaaagaactg gtttaacactg 1380
atgtggaggg cgaaatcatt atccgggcgt tgactgacgg gaaagttgac tccctgagtg 1440
tactgtcgg gcaaattggt aatccgggag acaaccttct gcaggttatt cctgagaaca 1500
ttgaaaatta ttatcttatt ctctgggtcc cgaatgatgc tgttccttat atttcggctg 1560

```

gtgacaaagt gaatattcgt tatgaagcct ttccggcaga aaaatttggg cagttttctg 1620
 ctacggttaa aactatatcc aggactcctg catcaacaca ggaaatgttg acctataagg 1680
 5 gagcaccaca gaatacgccg ggcgcctctg ttccctggta taaagtcatt gcgatgcctg 1740
 aaaagcagat tatcagatat gacgaaaaaa acctccctct ggaaaaatgga atgaaagccg 1800
 aaagtaact atttctggaa aaaaggcgta ttaccagtg gatgctttct cttttctatg 1860
 acatgaaaca cagtgaaca ggaccgctca atgactaacg ggaatttcag acaaattata 1920
 10 aatcagcttg atatgcgctg gcgacgctgt gttccgggta ttcacagac ggagaccgct 1980
 gaatgtggac tggcctgcct ggcaatgata tgcggtcatt ttggtaagaa tattgacctg 2040
 atatctcttc gtcgtaagtt taatctctcg gcccggtggag caaaccttgc aggaatcaat 2100
 ggaatagcgg agcagctggg gatgatcacc cgggctcttt cactggagct ggatgaactt 2160
 15 ggtgccctca aaatgccgtg tattctccac tgggatttca gtcacttctg cgtgctggtc 2220
 agcgtaaagc gtaaccgtta tgtactgcat gatccggcca gaggaagaag atatctcggg 2280
 cgggaggaaa tgagccggtt ttttacgggc attgcacttg aggtctggcc cggaggtgaa 2340
 ttccggacgg aaaccagca aaccgcata agtctccgtt cactgattaa cagtatttac 2400
 20 ggtattaaaa gaacactggc gaaaattttc tgtctgtcag ctgtaattga agcaatcaat 2460
 ctggtaatgc cgggtgggaac tcagctgggtt atggatcatg cgattccggc gggggaccga 2520
 gggctgctga cgcttatttc tgcctggcctg atgttcttta tattgctcag ggccgcggtg 2580
 25 agtatgctgc gtgcatggtc ctcaactggtt atgagcacgc tcatcaatat acagtggcag 2640
 tcgggtctgt ttaaccacct tctcagactg ccgctggcat ttttgaacg ccgtaaatta 2700
 ggtgatatcc agtcgcgttt tggctccctt gacactttga gggccacctt taccacctgt 2760
 gtggttgggg caatcatgga cagtattatg gttgtgggtg tttttgtgat gatgctggtt 2820
 30 tatggaggat atcttacctg gatagttctc ggttttacca tggtttacgt tcttattcgt 2880
 ctggtgacat acggctatta ccggcaaata tcggaagaaa ctcttgccag gggggcccg 2940
 gccagctcct attttatgga aagcctgtat ggtattgcca cggtaaaaat ccagggtatg 3000
 gtcgggatcc ggggaacaca ctggcttaac ctgaaaatag atgcgatcaa ttcagggtatt 3060
 35 aagttaacca ggatggattt gctcttcggg ggaataaata cttttgttgc cgcctgtgat 3120
 cagggtggca ttttatggct ggggtgcaagc cttgtgatcg ataacagat gacaataggg 3180
 atgtttgtgg catttggttc ttttcgtggg cagttttcgg atcgggttgc ttcgctgacc 3240
 40 agttttcttc ttcaactgag aataatgagt ctgcataatg agcgatttgc agatattgca 3300
 ctacatgaaa aggaagaaaa gaaaccggaa attgaaatcg ttgctgacat gagcccggtt 3360
 tcaactgaaa ccactgattt aagctaccgg tatgacagcc agtcagcaca ggtattcagt 3420
 ggtctgaatt tgtctgtggc tccgggagaa agtgtggcta taactggtgc ctccggtgcc 3480
 45 ggaaaaacca cattaatgaa agtattatgt ggactgtttg aaccagatag tggaaaagta 3540
 ctggttaatg gcaeggatat acgtcaactt ggaataaata attatcaccg tatgatagcc 3600
 tgtgttatgc aggacgaccg gctattttca ggatcaattc gtgaaaatat ctgtgggttt 3660
 gcagaagaaa cagacgacga atggatgaca gaatgtgcca gagcaagtca tattcatgat 3720
 50 gtgataatga aaatgccaat ggggtatgaa acgttaatag gtgaactggg ggaaggtctt 3780
 tccggcggtc aaaaacagcg tatattcatt gcccgagctt tataccggaa acctggaata 3840
 ttattfatgg atgaggctac aagttctctt gatacagaaa gtgaacgttt cgttaatgct 3900
 55 gccataaaaa aaatgaatat caccgggtg attattgcac acagagaaac tacgttgaga 3960
 actgttgaca ggattatttc tatttaaaat ccactggtgt aactttgtaa ggagtttgt 4020
 cgatggggga ggtcaagaag gatataaaaa taacagtgat tgcttttgtt atcaattatc 4080
 tgttctttta tattccggtg tcattatatc ttagttatta ctatggatat aattttttta 4140
 60 atctatatat gtttttttta tcaactgtag ttacattttt atcgttgttg ttaaacgtga 4200
 atttttactt cttcaciaat cttatagcga aggtgttgaa atgagaaaac tatctgaaaa 4260
 tgaaataaaa caaatatctg gaggtgacgg gaatgacggg caggcagaat taattgctat 4320
 65 tggttcactt gctggtagct ttattagccc gggatttggt tctattgcag gggcttatat 4380
 aggtgataaa gtacattcat gggcaacgac tgcgacggtt agtccctcca tgtctccctc 4440

```

aggatatagga ttatcatccc agtttggatc cggcagaggt acatcaagtg cctcttcgtc 4500
tgcgggggagt ggaagttaaa ccttatattg ttaatgaagc acctgttaca ggtgcttcat 4560
tatatgataa tgggtgcctat gtaacgcttt aagttaggct cctccgaacg tttattatct 4620
tatgcatacc gcatagtaac aatgccagtc cgtttaatct ttatcatatg agattgtaac 4680
agaaaaatgct ctgttaatga gtataactga tagaagccag atattgtatt cctgctatga 4740
ctgcattcat cgacatgtga agtaatatgg gcattaacag gccattcgac tttatttttg 4800
cactaataag aactaacgat accagaaaga gcatcaaaaa tgtatgaaag tcagtatatt 4860
gtagatgtaa tgcagaaaaat atgactgatg ttacaatagc agaggtgtaa atattgtcat 4920
taaaccagaa tttaaaagag ttaaaaagac accctcgaaa tacaatctct tcatatacag 4980
gaacaagaag tacagaagaa aatatattaa tccataaaat ggctccggaa aaagacattt 5040
gcgagatcat ccattcttcc gttttcctca ctgccagcag ataagggaca aataactgaa 5100
taatcattat taaagagaaa agagtataaa aaacatccag ccgaaaagaa cctcttccta 5160
atccttctct ttttcggaag aaaataaaat acagtggaaac aagaattaga aattcagcaa 5220
gaaataatgc tggaacaaga agtcccctgg atataagttc ctgcctgttt gtaagaaatg 5280
caggaataaa ggtaatagaa aatgataaag taaacattga aaagcagccg gctgatgact 5340
gtttttttat agttgcattt ttattttttg tcatttccat t 5381

```

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz mit der in **Abb. 1** dargestellten Nucleotidfolge.
2. Verwendung der DNA-Sequenz nach Anspruch 1 in der mikrobiologischen Analytik und/oder Diagnostik.
3. Verwendung der DNA-Sequenz nach Anspruch 1 in der Biotechnik als Expressionsvektor oder als Bestandteil von Multi-Copy-Plasmiden zur Herstellung des antimikrobiellen Wirkstoffes.
4. Peptid mit der in **Abb. 2** dargestellten Aminosäuresequenz.
5. Verwendung des Peptids nach Anspruch 4 zur Herstellung von Antipeptid-Antikörpern.
6. Verwendung des Peptides nach Anspruch 4 als antimikrobieller Wirkstoff zu mikrobiologischen oder medizinischen Zwecken.
7. Oligopeptide mit den in **Abb. 3** dargestellten Aminosäuresequenzen.
8. Verwendung der Oligopeptide nach Anspruch 7 zur Herstellung von Antipeptid-Antikörpern.
9. Verwendung der Oligopeptide nach Anspruch 7 als antimikrobielle Wirkstoffe zu mikrobiologischen oder medizinischen Zwecken.
10. Lipopeptide nach Anspruch 4 oder 7, gekennzeichnet durch Kopplung zu Pam₃Cys-Lys-Ser-Peptiden.
11. Peptide nach Anspruch 4 oder 7, gekennzeichnet durch Kopplung zu Biotinyl-Aca-Aca-Peptiden.
12. Verwendung der Lipopeptide nach Anspruch 10 zur Herstellung von Antiseren.
13. Verwendung der Peptide nach Anspruch 11 zur Herstellung von ELISA-Tests.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

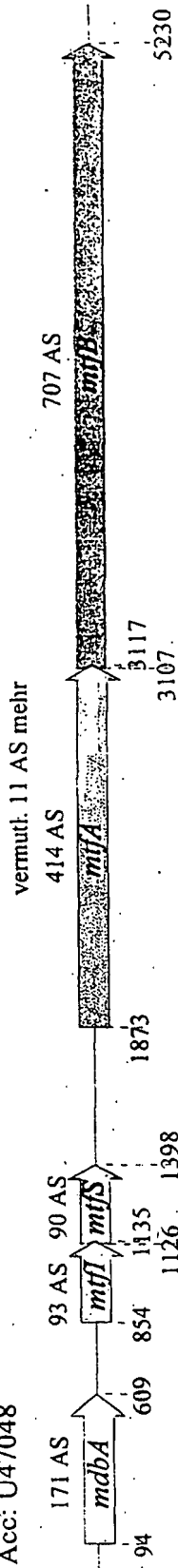
Abbildung 1 Die 5381 Basenpaare lange DNA-Sequenz der kompletten mcm-Region aus E. coli DSM 6601

ID MCM PRELIMINARY: DNA: 5381 BP.
 SQ SEQUENCE: 5381 BP; 1601 A; 971 C; 1269 G; 1540 T; 0 OTHER;
 ATAAGGGAAA TAGTAATCAT GTCTTATATA AGGGAAACCA TCAGAGGAAA AGATGAATGG;
 ACTGTTTATG AACAGATCCG TTTTGCGGTC AGTTGTATGC TCTACAATCG TAATTACAGT
 CTGTATCCGG TGTAAACCAT TCAATACTGG ACTGAATATG CGATACAGCA TAATCAGATT
 AAATTCCTGT TTGATTACAG AGGTTTTCCTA CTGGCGTATA TTACCTGGGC ATATCTTGAG
 GCTGATACAG AAGCACGCC TCTCAGGGAT CCAGAATTCA GGTTCGATCC GTCTGAATGG
 AATGAAGATG GAAGGATCTG GATTCTGGAT TTCTGTTGTA AACCAGGCTT TGGTCGAAAA
 GTTATTGACT ATCTCATACA GCTTCAGCCA TGGGAGAGA GAGAAGTACG ATGCTTAAGC
 AGGCGAAAAG AAATTGTGAC ATACATCCCT GAGCGGCTGC ATAAAAACGTA GTACCTCTGA
 AGATACAGAG ATAATTGTAA ATTACGGGGT AAATGCATCG CTGATACTAT TTTGACAGGA
 CTCTGTATTT TCTGGCTTTG ATTATAGCAT TTCCGGTTAAC CAGTGAAGGT ATTACAGGAA
 AAGTGTGAGT AAGAGGAGCT ATTTTGTTC GTCCAGGATGC TTTAGAAAAAC AGAAAAATGA
 AGTGGCAGGG ACGGGCAATA TTACTTCCCG GAATACCACT ATGGTTAATC ATGCTGGGAA
 GCATAGTGTT TATTACGGCA TTTCTGATGT TCATTATTGT TGGTACCTAT AGCCGCCGTG
 TTAATGTCAG TGGTGAGGTC ACAACCTGGC CAAGAGCTGT CAATATATAT TCAGGTGTAC
 AGGGATTGT GTTCAGGCAG TTTGTTTCATG AAGGACAGTT GATAAAAAAA GGGGATCCCTG
 TTTATCTGAT TGACATCAGT AAAAGTACAC GTAGTGGTAT TGTCAGTAT AATCATCGTC
 GGGATATAGA AAACCAGCTG GTTCGTGTGG ACAAGATTAT TTCCCGTCTG GAAGAAAGTA
 AAAAAATAAC GCTGGATACC CTGGAAAAAC AACGCCTGCA ATACACAGAT GCGTTTCGTC
 GCTCATCAGA TATTATACAG CGTGCAGAGG AAGGGATAAA AATAATGAAA AACAACATGG
 AGAATTACAG AAACATACAG ACAAAGGGC TGATTAATAA AGATCAGTTA ACTAACCAGG
 TGGCATTATA TTATCAGCAA CAAAACATC TTCTTAGCCT GAGCGGACAG AACGAACAGA
 ATGCCCTGCA GATAACCACT CTGGAGAGTC AGATTACAGC TCAGGCAGCA GATTTTGATA
 ACCGTATCTA CCAGATGGAA CTGCAACGGT ACGAGTTACA GAAAGAACTG GTTAACACTG
 ATGTGGAGGG CGAAATCATT ATCCGGCGCT TGACTGACGG GAAAGTTGAC TCCCTGAGTG
 TCACTGTCCG GCAATGGTC AATCCCGGAG ACAACCTTCT GCAGGTATT CCGTGAACA
 TTGAAAATTA TTATCTTATT CTCTGGGTCC CGAATGATGC TGTTCTTAT ATTTCCGCTG
 GTGACAAAAGT GAATATTCST TATGAAGCCT TTCCGGCAGA AAAATTTGGG CAGTTTCTG
 CTACGGTTAA AACTATATCC AGGACTCCTG CATCAACACA GGAATGTTG ACCTATAGG
 GAGCACCACA GAATACGCCG GCGCCTCTG TTCCCTGGTA TAAAGTCATT GCGATGCTG
 AAAAGCAGAT TATCAGATAT GACGAAAAAA ACCTCCCTCT GGAATATGGA ATGAAAGCCG
 AAAGTACACT ATTTCTGGAA AAAAGGCGTA TTTACCAGTG GATGCTTTCT CTTTCTATG
 ACATGAAACA CAGTGCAACA GGACCGCTCA ATGACTAACG GGAATTTTCTG ACAAATTATA
 AATCAGCTTG ATATGCGCTG GCGACGCTGT GTTCCGGTTA TTCATCAGAC GGAGACCGCT
 GAATGTGGAC TGGCCTGCCT GGCATGATA TGCGGTCAIT TTGGTAAGAA TATTGACCTG
 ATATCTCTTC GTCGTAAGTT TAATCTCTCG GCGCGTGGAG CAAACCTTGC AGGAATCAAT
 GGAATAGCCG AGCAGCTGGG GATGATCACC CGGGCTCTTT CACTGGAGCT GGATGAACCT
 GGTGCCCTCA AAATGCCGTG TATTCTCCAC TGGGATTTCA GTCACCTCGT CGTGCTGGTC
 AGCGTAAAGC GTAAACCTTA TGTAATGCAAT GATCCGGCCA GAGGAAGAG ATATCTCGGT
 CGGGAGGAAA TGAGCCGGTA TTTTACGGGC ATTGCACCTG AGGTCTCGCC CGGAGGTGAA
 TTCCGGACCG AAACCCAGCA AACCCGCAAT AGTCTCCGTT CACTGATTAA CAGTATTATC
 GGTATTAAAA GAACACTGGC GAAAAATTTT TGCTGTGTCAG CTGTAATGA AGCAATCAAT
 CTGGTAATGC CGGTGGGAAC TCAGCTGGTT ATGATCATG CGATTCCGGC GGGGGACCGA
 GGGCTGCTGA CGCTTATTTT TGCTGGCCTG ATGTTCTTTA TATTGCTCAG GGCCGCGGTG
 AGTATGCTGC GTGCATGGTC CTCACCTGTT ATGAGCACGC TCATCAATAT ACAGTGGCAG
 TCCGGTCTGT TTAACCACTT TCTCAGACTG CCGCTGGCAT TTTTGAACG CCGTAAATTA
 GGTGATATCC AGTCGGGTTT TGGCTCCCTT GACACTTCTG GTTGTGGGTG TTTTGTGAT
 GTGGTGGGG CAATCATGGA CAGTATTATG GTTGTGGGTG TTTTGTGAT GATGCTGTTA
 TATGGAGGAT ATCTTACCTG SATAGTTCTG GGTTTTACCA TGGTTTACCT TCTTATTCCT
 CTGGTGACAT ACGGCTATTA CCGGCAATA TCGGAAGAAA CTCTGTGTCAG GGGGGCCCGC
 GCGAGCTCCT ATTTTATGGA AAGCCTGTAT GGTATTGCCA CGGTAAAAAT CCAGGGTATG
 GTCCGGATCC GGGGAACACA CTGGCTTAAC CTGAAAATAG ATCCGATCAA TTCAGGTATT
 AAGTTAAACA GGATGGATTT GCTCTTCGGG GGAATAATA CTTTTGTGTC CCGCTGTGAT
 CAGGTGGCGA TTTTATGGCT GGGTGCAAGC CTGTGTATCG ATAAATCAGT GACAATAGGG
 ATGTTTGTGG CATTTGGTTC TTTTCTGGG CAGTTTTTCG ATCCGGTTCG TTCGCTGACC
 AGTTTTCTTC TTCAACTGAG AATAATGAGT CTGCATAATG AGCGCATTGC AGATATTGCA
 CTACATGAAA AGGAAGAAA GAAACCGGAA ATTGAATTCG TTGTGACAT GAGCCCGGTT
 TCACTGGAAG CCACCTGATT AAGCTACCGG TATGACAGCC AGTCAGCACA GGTATTGAGT
 GGTCTGAATT TGCTGTGGC TCCGGGAGAA AGTGTGGCTA TAACCTGGTC CTCCGGTGCC
 GGAAGAACCA CATTAATGAA AGTATTATGT GGAATGTTG AACAGATAG TGGAAAAAGTA
 CTGGTTAATG GCACGGATAT ACGTCAACTT GGAATAATA ATTATCACCG TATGATAGCC
 TGTGTTATGC AGGACGACCG GCTATTTTCA GGATCAATTC GTGAAAATAT CTGIGGGTTT
 GCAGAAAGAA CAGACGACGA ATGGATGACA GAATGTGCCA GAGCAAGTCA TATTATGAT
 GTGATAATGA AAATGCCAAT GGGGTATGAA ACGTTAATAG GTGAACTGGG GGAAGGTCTT
 TCCGGCGGTC AAAACACGCG TATATTCATT GCGCGAGCTT TATACCGGAA ACCTGGAATA
 TTATTTATGG ATGAGGCTAC AAGTTCTCTT GATACAGAAA GTGAACGTTT CGTTAATGCT

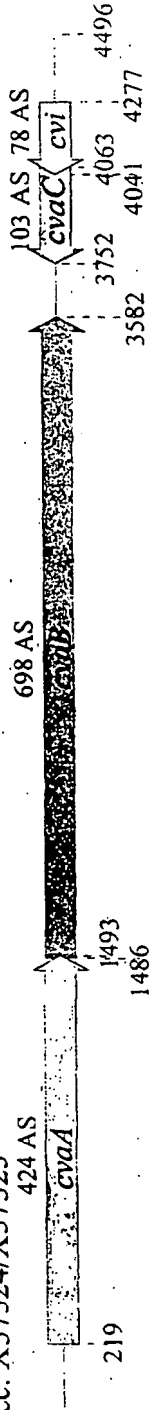
GCCATAAAAA AAATGAATAT CACCCGGGTG ATTATTGCAC ACAGAGAAAC TACGTTGAGA
ACTGTTGACA GGATTATTTT TATTTAAAAAT CCACTGGTGT AACTTTGTAA GGAGTTTGT
CGATGGGGGA GGTCAAGAAG GATATAAAAA TAACAGTGAT TGCTTTTGTT ATCAATTATC
TGTTCTTTTA TATTCGGGTG TCATTATATC TTAGTTATTA CTATGGATAT AATTTTTTTA
ATCTATATAT GTTTTTTTTA TCACTTGTAG TTACATTTT ATCGTTGTGG TTAACCGTGA
ATTTTTACTT CTTACAAAT CTTATAGCGA AGGTGTTGAA ATGAGAAAAC TATCTGAAAA
TGAAATAAAA CAAATATCTG GAGGTGACGG GAATGACGGG CAGGCAGAAT TAATGCTAT
TGGTTCACCT GCTGGTACGT TTATTAGCCC GGGATTTGGT TCTATTGCAG GGGCTTATAT
AGGTGATAAA GTACATTCAT GGGCAACGAC TGCGACGGTT AGTCCCTCCA TGTCTCCCTC
AGGTATAGGA TTATCATCCC AGTTTGGATC CGGCAGAGGT ACATCAAGTG CCTCTTCGTC
TGCGGGGAGT GGAAGTTAAA CCTTATATTG TTAATGAAGC ACCTGTTACA GGTGCTTCAT
TATATGATAA TGGTGCCTAT GTAACGCTTT AAGTTAGGCT CCTCCGAACG TTTATTATTT
TATGCATACC GCATAGTAAC AATGCCAGTC CGTTTAATTT TTATCATATG AGATTGTAAC
AGAAAATGCT CTGTTAATGA GTATAACTGA TAGAAGCCAG ATATTGTATT CCTGCTATGA
CTGCATTAT CATGACATGTGA AGTAATATGG GCATTAACAG GCCATTTCGAC TTTATTTTTG
CACTAATAAG AACTAACGAT ACCAGAAAAG GCATCAAAAA TGTATGAAAG TCAGTATATT
GTAGATGTAA TGCAGAAAAT ATGACTGATG TTACAATAGC AGAGGTGTAA ATATTGTCAT
TAAACCAGAA TTTAAAAGAG TTA AAAAGAC ACCCTCGAAA TACAATCTCT TCATATACAG
GAACAAGAAG TACAGAAGAA AATATATTAA TCCATAAAAT GGCTCCGGAA AAAGACATTT
GCGAGATCAT CCATTCTTCC GTTTTCCTCA CTGCCAGCAG ATAAGGGACA AATAACTGAA
TAATCATTAT TAAAGAGAAA AGAGTAAAAA AAACATCCAG CCGAAAAGAA CCTCTTCCTA
ATCCTTCTCT TTTTCGGAAG AAAATAAAAT ACAGTGGAAC AAGAATTAGA AATTCAGCAA
GAAATAATGC TGGAACAAGA AGTCCCTGG ATATAAGTTC CTGCCTGTTT GTAAGAAATG
CAGGAATAAA GGTAATAGAA AATGATAAAG TAAACATTGA AAAGCAGCCG GCTGATGACT
GTTTTTTTAT AGTTGCATTT TTATTTTTTG TCATTTCAT T

Abbildung 1a Organisation des Gen-Clusters der mcm-Region aus E. coli DSM 6601 mit den für die Microcin-Synthese, -Prozessierung und -Ausscheidung notwendigen Genabschnitten (unten) und Vergleich mit den Gen-Clustern für die Produktion von Microcin 24 (oben) und Colicin V (mitte).

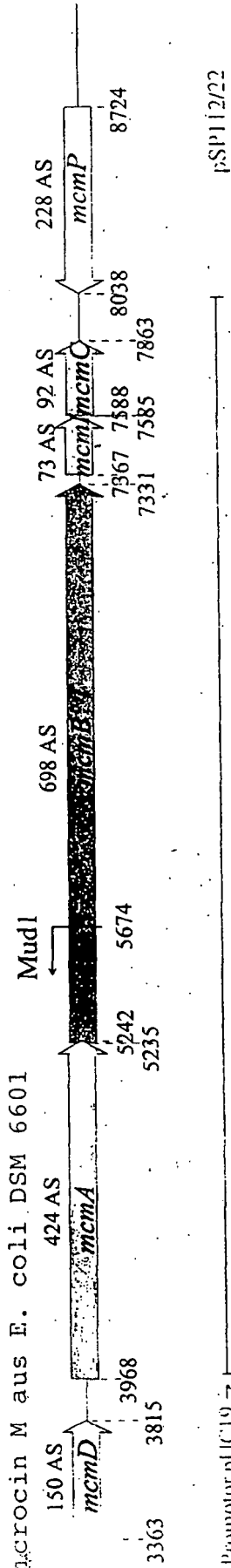
Microcin 24 Acc: U47048



Colicin V Acc: X57524/X57525



Microcin M aus E. coli DSM 6601



lacZ-Promotor pUC19 →

→ CvaI-Pr.

→ CvaI3-Pr.

Abbildung 2 Aminosäuresequenz des antimikrobiellen Peptids
(Microcin M, MmcC) aus *E. coli* DSM 6601

Protein 1	DGNDGQAELIAIGSLAGTFISPGFGSIAGAYIGDKVHS WATTATVSPSMSPSGIGLSSQFGSGRGTSSASSSAGSGS
------------------	---

Abbildung 3 Überlappende Oligopeptide (Teilsequenzen) aus
dem antimikrobiellen Peptid (Microcin M, MmcC)
aus *E. coli* DSM 6601

Peptide	Mol. Weight (mol/g)	Weight (mg)	mmol	Mixture	Protein
1. DGNDGQAELIAIGSLA	1543.7	0.46	0.0003	M.1	1
2. GQAELIAIGSLAGTFI	1560.8	0.47	0.0003	M.1	1
3. LAIGSLAITFISPGFG	1507.8	0.45	0.0003	M.1	1
4. LAGTFISPGFGSIAGA	1465.7	0.44	0.0003	M.1	1
5. ISPGFGSIAGAYIGDK	1552.8	0.47	0.0003	M.1	1
6. GSIAGAYIGDKVHWSA	1631.8	0.49	0.0003	M.1	1
7. AYIGDKVHSWATTATV	1719.9	0.52	0.0003	M.1	1
8. KVHSWATTATVSPSMS	1689.9	0.51	0.0003	M.1	1
9. ATTATVSPSMSPSGIG	1463.6	0.44	0.0003	M.1	1
10. VSPSMSPSGIGLSSOF	1580.8	0.47	0.0003	M.1	1
11. SPSSGIGLSSQFGSGRG	1493.6	0.45	0.0003	M.1	1
12. GLSSQFGSGRGTSSAS	1485.6	0.45	0.0003	M.1	1
13. FGSGRGTSSASSSAGS	1402.4	0.42	0.0003	M.1	1
14. SGRGTSSASSSAGSGS	1342.3	0.40	0.0003	M.1	1